

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26420794

研究課題名(和文) 未分化性が高く均一なヒトiPS細胞を取得するための新規培養法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel culture method for obtaining human iPS cells with high pluripotency

研究代表者

黒澤 尋 (KUROSAWA, Hiroshi)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：10225295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、未分化性が高く均一なヒトiPS細胞を取得するために、同調培養法によって細胞周期を揃える試みと、低酸素環境がヒトiPS細胞の未分化性に及ぼす影響を検討した。有糸分裂期で細胞周期を停止させるNocodazoleでヒトiPS細胞を処理した。その結果、Nocodazole濃度400 ng/mlで8時間の処理を行うと細胞集団の約80%がG2/M期に同調することがわかった。しかし、Nocodazoleは未分化関連遺伝子の発現量には影響しなかった。低酸素環境下で培養した時の細胞の挙動より、酸素要求性の高い分化細胞が除去され、細胞集団における未分化ヒトiPS細胞の割合が高まる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)： In this study, we attempted to synchronize the cell cycle of human iPS cells in the same phase and investigated the effect of hypoxic conditions on human iPS cells in order to obtain highly homogeneous cell population with maintaining pluripotency. Human iPS cells were treated with nocodazole that can hold cells at the phase of mitosis (G2/M phase) in cell cycle. As the result, when human iPS cells were treated with 400 ng/ml nocodazole for 8 hours, 80% of cell population synchronized cell cycle at G2/M phase. However, nocodazole had no effect on the expression of undifferentiated-related genes.

The results in hypoxic culture indicated that differentiating cells with high oxygen demand can be eliminated under hypoxic conditions, and then suggested the possibility of enrichment of undifferentiated human iPS cells.

研究分野：細胞培養工学

キーワード：ノコダゾール 細胞周期同調 ヒトiPS細胞 未分化維持

## 1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞を利用した再生医療を実現するには、分化効率やプロセスの再現性を高める必要があり、そのためには未分化性の高い均一な iPS 細胞が供給されなければならない。

ヒト iPS 細胞は、培養皿に接着させ、細胞集団 (コロニー) 状に増殖させるが、このコロニーを分散してバラバラにすると細胞死が起こるといった脆弱性を有している。このため、ヒト iPS 細胞のコロニーはシングルセル化せず、小集塊レベルで取り扱われるのが一般的である。しかし、小集塊はさまざまな状態の細胞を含む不均一な集団となる可能性があり、このことが再現性低下の一因となっている。我々は、コロニーを均一な細胞集団として形成させるには播種細胞の細胞周期を揃えるのが効果的であるとの考えに至った。よって本研究では、「同調培養法」をヒト iPS 細胞に適用し、細胞の均一性を高めることを検討する。

研究分担者の望月は、ES 細胞においてノコダゾール (Nocodazole) 処理による同調培養の実績 (Nishiyama *et al.*, FEBS Lett., 582, 1501 (2008)) があり、ノコダゾールがエピゲノム異常を持つ細胞の増殖を抑制する効果があることを見いだしている。よって、Nocodazole 処理によってエピゲノム異常の細胞を除去できると考えられ、細胞の均一性を高められると期待される。

ヒト iPS 細胞は通常フィーダー細胞と共培養されるが、フィーダー細胞はマウス由来であるため、最終的には iPS 細胞とフィーダー細胞は完全に分離されなければならない。よって、フィーダー細胞を用いずに (Non-feeder で) コロニーを形成させる培養法が検討されている (Pakzad *et al.*, Stem Cell Rev., 6, 96 (2010))。フィーダー細胞には、ヒト iPS 細胞の未分化性維持と接着・増殖をサポートする役割がある。Non-feeder の条件では、このサポートが期待できなくなるため、フィーダー細胞に代わる因子を添加する必要がある。これまで、細胞外マトリックス (Matrigel) や conditioned medium の利用が検討されてきた。

本研究では、「低酸素培養法」をヒト iPS 細胞の未分化維持に利用した Non-feeder の培養法を開発する。研究代表者の黒澤は、ES 細胞の未分化性に及ぼす酸素濃度の影響を検討した実績 (Kurosawa *et al.*, J. Biosci. Bioeng., 101, 26 (2006)) があり、酸素濃度が細胞の未分化性維持や分化指向性に影響を及ぼすことを明らかにしている。

低酸素環境が幹細胞の未分化性維持にもたらすプラスの効果に関しては、いくつかの報告がなされている (Wion *et al.*, Cell Stem Cell, 5, 242 (2009))。Yoshida らは、体細胞の初期化 (iPS 細胞の樹立) において、5% O<sub>2</sub> の低酸素条件が iPS 細胞の誘導効率を上昇させることを見いだしている (Yoshida *et al.*,

Cell Stem Cell, 5, 237 (2009))。以上のことから、酸素濃度は、ヒト iPS 細胞の未分化性維持にかかわる重要な因子であると考えられる。

したがって、同調培養と低酸素培養の条件を最適化することによって、未分化性の高い均一なヒト iPS 細胞の供給が可能になると思われる。

## 2. 研究の目的

iPS 細胞は再生医療の細胞供給源として期待されている。従って、安全で均質な iPS 細胞を取得できる培養方法の確立が望まれている。再生医療に用いられる分化細胞は、細胞加工 (分化誘導) プロセスを経て iPS 細胞から作出されるが、分化効率やプロセスの再現性を高めるには、iPS 細胞は未分化性の高い均一な細胞集団でなければならない。

本研究では、未分化性が高く均一なヒト iPS 細胞を取得するために、同調培養法と低酸素培養法を応用した新規な培養法を開発を行う。すなわち、細胞周期を揃えた均一なヒト iPS 細胞を、低酸素環境で培養することによってその未分化性を維持しつつ均一に増殖させ、高品質なヒト iPS 細胞を取得できる新規な培養法を開発する。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト iPS 細胞

理研バイオリソースセンターから分譲された 201B7 株を使用した。

### (2) 同調培養

Nocodazole (CALBIOCHEM®) は、チューブリンに結合して微小管の形成を妨げ、有糸分裂期に当たる G2/M 期細胞分裂を停止する。Nocodazole 濃度を 0-800 ng/mL の範囲で変化させ、ヒト iPS 細胞を処理した。処理期間は、フィーダー細胞共存下では、6 日間培養する内の 6 日目の 1 日間とした。フィーダー細胞非存在下では、4 日間培養する内の 4 日目の 1 日間とした。

### (3) 同調解析

細胞周期では、細胞構成成分の増大と細胞分裂のサイクルが繰り返される。細胞周期の最も重要な特徴は、細胞分裂の前に起こる核 DNA の合成 (Synthesis: S 期) 細胞分裂のプロセス/有糸分裂 (Mitosis: M 期) である。M 期と S 期の間には G1 期があり、体細胞のほとんどのは通常 G1 期にある。S 期が終了してから有糸分裂が始まるまでの間に一時的な遅延があり、この期間を G2 期と呼んでいる。従って、細胞周期のサイクルは、G1 S G2 M G1・・・となる。

Nocodazole は、微小管形成を阻害するので、

この作用により細胞分裂は細胞周期の G2/M 期で停止する。細胞がM期にあるとき、細胞はDNA量(染色体)が2倍になっているので、DNAをプロピジウムイオダイド(PI)で蛍光PI染色(Cell cycle detection kit)し、蛍光強度を測定(Tali™ image-based cytometer)すれば、同調細胞は2倍の蛍光強度を示すはずである。よって、蛍光PI染色により同調度合いを解析した。

#### (4) 低酸素環境培養

窒素ガスによりさまざまな低酸素環境(5%、2%、1% O<sub>2</sub>)を作りだし、ここでヒトiPS細胞培養して、細胞増殖挙動(コロニー形成)の観察、及び細胞の未分化性維持に及ぼす酸素の影響を明らかにした。PCR法による未分化関連遺伝子Oct4、Nanogの発現量解析した。

## 4. 研究成果

### (1) フィーダー細胞共存下で培養したヒトiPS細胞の細胞周期同調の試み

Nocodazole濃度を0-800 ng/mLの範囲で変化させ、ヒトiPS細胞を処理したのち、同調解析を行った。PI染色により蛍光強度が強く表れる細胞をG2/M期に同調された細胞として、そのパーセンテージをTable 1に示した。

いずれの濃度で処理した場合も、G2/M期の細胞の割合が有意に増加することはなく、細胞同調はされていないことがわかった。

これは、フィーダー細胞にNocodazoleが吸収されてしまうために、ヒトiPS細胞への効果が低減したためであると考えられる。よって、次にフィーダー細胞非共存下においてNocodazoleの作用を検討した。

Table 1 フィーダー細胞共存下でのNocodazole処理により同調された細胞の割合

	G0/G1期(%)	G2/M期(%)
Control	46.10	53.90
DMSO	44.63	55.37
Nocodazole	45.29	54.71
200 ng/mL		
Nocodazole	44.60	55.40
400 ng/mL		
Nocodazole	42.58	57.42
800 ng/mL		

### (2) フィーダー細胞非存在下で培養したヒトiPS細胞の細胞周期同調に及ぼすNocodazole濃度の影響

Nocodazole濃度を0-800 ng/mLの範囲で変化させ、ヒトiPS細胞を処理したのち、同調解析を行った。PI染色により計測された同調解析をパーセンテージ化したものをFig. 1に示した。Nocodazole濃度が400 ng/ml以上になると同調効果が現れた。

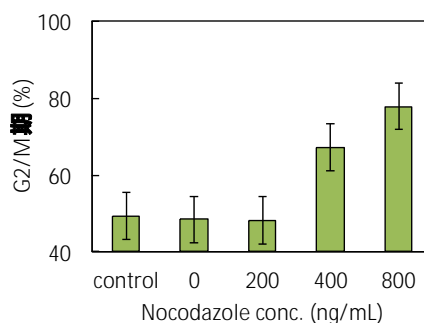


Fig.1 細胞周期の同調率に及ぼすNocodazole濃度の影響

しかし、Fig.2に見られるように、生細胞数は、Nocodazole濃度が高くなるほど、減少した。Nocodazoleは細胞毒性があると考えられるため、できるだけ濃度が低い方がよいと判断し、以後、使用濃度を400 ng/mlとした。

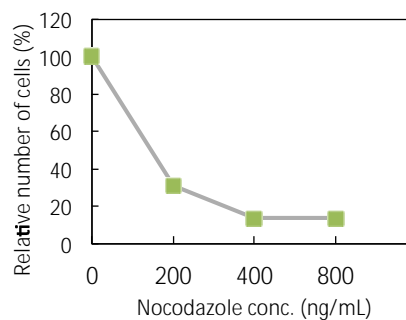


Fig.2 生細胞数に及ぼすNocodazole濃度の影響

### (3) フィーダー細胞非存在下で培養したヒトiPS細胞の細胞周期同調に及ぼすNocodazole処理時間の影響

これまでの結果より、Nocodazole処理の濃度として400 ng/mlを選択したが、Nocodazoleには細胞毒性があるので、細胞同調に適する処理期間についても検討をおこなった。

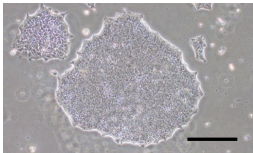
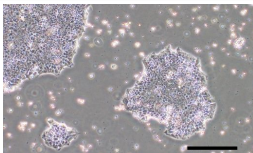
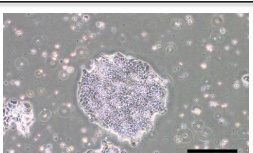
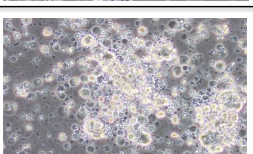
Table 2にNocodazole時間と細胞様相の関係を示した。処理時間8時間までは、境界が明確なコロニー形成が確認されたが、処理時間24時間では、死細胞が増え、明確なコロ

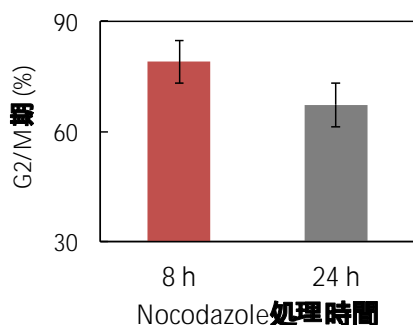
二形成は認められなかった。

同調解析の結果、Fig. 3に示すように、処理時間8時間において、約80%の細胞がG2/M期に同調されていた。よって、Nocodazole処理時間を8時間、処理濃度400 ng/mlとした。

Nocodazole 処理後の細胞における未分化関連遺伝子と初期分化関連遺伝子の発現量を調べたところ、それらの発現量にはNocodazole 処理による影響は見られなかった。細胞培養が未分化を維持する環境で行われているため、コントロール条件においても未分化状態から逸脱する細胞は少ないため、同調培養により未分化細胞の均一性が高まるかどうかを確認するには至らなかった。

**Table 2 Nocodazole 処理後の細胞様相**

Exposure Duration (h)	(Scale bar is 200 μm)
0	
4	
8	
24	



**Fig.3 細胞周期の同調率に及ぼす Nocodazole 処理時間の影響**

#### (4) Nocodazole 処理期間の違いがヒト iPS 細胞の心筋細胞分化に及ぼす影響

これまでの研究成果により、微小管形成阻害剤である Nocodazole 処理によって、ヒト iPS 細胞の細胞周期の同調が可能であることが明らかになったが、ヒト ES 細胞においては、Nocodazole 処理により多能性関連遺伝子の発現量が減少することが報告されている (Kallas, A., et al., PLoS One. 2011 Apr 29;6(4):e19114. doi: 10.1371)。このことから、我々は Nocodazole の細胞周期同調効果によってヒト iPS 細胞の均一性を高めると同時に、分化誘導を促進できると考えた。本研究では、Nocodazole 処理期間の違いが、ヒト iPS 細胞の心筋細胞分化に及ぼす影響について明らかにした。

単層培養したヒト iPS 細胞 (201B7, RIKEN BRC) を分散して、4 日間の浮遊培養を行い胚様体 (EB) を形成した。その後、心筋分化誘導培養を 12 日間行った。Nocodazole 処理は、EB 形成の前段階で 1 日間処理した群 (前処理群)、EB 形成の全期間中処理した群 (全処理群)、EB 形成期間の後期で 1 日間処理した群 (後処理群) の 3 条件で行い、Nocodazole なしの群をコントロールとした。いずれの群も Nocodazole 濃度は 200ng/mL とした。

ヒト ES 細胞の場合とは異なり、Nocodazole 処理してもヒト iPS 細胞における多能性関連遺伝子 (OCT3/4, NANOG) の発現量は、コントロールに比べて低下しなかった。全処理群では、むしろ NANOG の発現量が顕著に増加した。

心筋細胞分化に及ぼす Nocodazole 処理の影響では、前処理群において、心筋の拍動が始まる時期が他の処理群よりも早くなり、すべての EB で拍動が観察された (拍動率 100%)。全処理群では心筋の拍動が見られたのは心筋分化誘導を行った EB の 60% 程度にとどまった。心筋関連遺伝子 (GATA4, TNNT2, MHC, MLC2a) の発現量を調べた結果、全処理群では心筋関連遺伝子の発現量が減少傾向にあることが分かった。

以上の結果より、ヒト iPS 細胞においては Nocodazole 処理しても未分化性は低下しなかった。しかし、EB 形成の前段階で短期間 Nocodazole 処理を行うと心筋分化誘導が早まる傾向が示唆された。

#### (5) 低酸素環境がヒト iPS 細胞の生育と分化に及ぼす影響

本研究では低酸素環境下における培養がヒト iPS 細胞の増殖性や未分化性などの細胞挙動にどのような影響を及ぼすのかについて検討した。ヒト iPS 細胞を酸素濃度 (1%、2%、18% O<sub>2</sub>) 環境下で生育させた。

酸素濃度 (1%、2%、18% O<sub>2</sub>) 環境で生育させた場合、酸素濃度に依存して、細胞様相や生

細胞率に関して差がみられた。すなわち、酸素濃度が高いほど細胞の接着率と増殖力は良好であった。生細胞率に関しては、低酸素環境下、特に1% O<sub>2</sub>において値が低くなった。このことから、ヒト iPS 細胞が生育するには2% O<sub>2</sub> 以上の酸素濃度が必要であることが示唆された。

低酸素環境下(1% O<sub>2</sub>)における培養では、細胞が器面から剥離した部分が目立つようになり、コロニーの細胞密度が低下した。未分化なヒト iPS 細胞は、分化が進んだ細胞よりも低酸素に強いことが知られていることから、1~2% O<sub>2</sub>の低酸素環境下では、酸素要求性の高い細胞へと分化が進んだ細胞が死滅したのではないかと推察した。

リアルタイム RT-PCR で未分化関連遺伝子、初期分化関連遺伝子、及び低酸素関連遺伝子の発現量を測定した。その結果、未分化関連遺伝子については、低酸素環境下で培養を行っても発現量が増大する傾向は見られず、初期分化関連遺伝子の発現が増大した。

低酸素関連遺伝子については、通常酸素環境下で培養した場合に比べて、低酸素環境下において高発現していた。このことから低酸素シグナルは細胞に伝わっており、細胞代謝は低酸素対応に転換していると推察した。

以上の結果より、低酸素環境下における培養により、ヒト iPS 細胞よりも酸素要求性の高い分化細胞を除去できる可能性が示された。しかし、細胞集団の未分化性を高めるには至らず、むしろ低酸素環下では初期分化が促進される可能性が示唆された。

## (6) まとめ

本研究では、未分化性が高く均一なヒト iPS 細胞を取得するために、同調培養法によって細胞周期を揃える試みと、低酸素環境がヒト iPS 細胞の未分化性に及ぼす影響を検討した。すなわち、細胞周期を揃えた均一なヒト iPS 細胞を、低酸素環境で培養することによってその未分化性を維持しつつ均一に増殖させ、高品質なヒト iPS 細胞を取得ことをめざした。

有糸分裂期で細胞周期を停止させる Nocodazole (濃度 400 ng/ml、8 時間) で処理を行うと、細胞集団の約 80% が G2/M 期に同調することがわかったが、当初目的とした未分化性が高く均一なヒト iPS 細胞を取得するには至らなかった。ヒト iPS 細胞の世代時間(分裂に要する時間)が約 20 時間であることを考慮すると、Nocodazole 処理時間は 24 時間程度は必要であると思われる。Nocodazole の細胞毒性を避けつつ、十分な細胞周期同調効果を得るには、さらなる検討が必要である。

低酸素環境下での培養により、酸素要求性の高い分化細胞が除去され、細胞集団における未分化ヒト iPS 細胞の割合が高まる可能性

が示された。しかし、低酸素条件下では細胞増殖が阻害されるため、未分化細胞を効率よく増やしながらか、一方では、分化細胞を死滅させるような培養法を確立するには、さらなる検討が必要ある。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

山口千尋、大貫喜嗣、黒澤 尋、ノコダゾール処理によるヒト iPS 細胞の心筋分化誘導

第 68 回日本生物工学会大会、2016 年 9 月 28 日、富山国際会議場(富山県富山市)

山口千尋、大貫喜嗣、黒澤 尋、Nocodazole 処理によるヒト iPS 細胞の細胞周期同調

第 66 回日本生物工学会大会、2014 年 9 月 10 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

山梨大学研究者総覧

[http://erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A\\_Display.Scholar/0/BC049428387331DC.html](http://erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A_Display.Scholar/0/BC049428387331DC.html)

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

黒澤 尋 ( KUROSAWA, Hiroshi )

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：10225295

(2) 研究分担者

望月 和樹 ( MOCHIZUKI, Kazuki )

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：80423838

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし